

PB1.2. Cílení na protein-proteinové interakce v leukemii (Řezáčová)

Cíle výzkumu

- Ověření možnosti cílení na vybrané protein-proteinové interakce s využitím technik strukturní biologie.
- Konstrukce rozsáhlé a různorodé knihovny fragmentů s pomocí dat z předcházejícího testování.
- Rozvíjení vybraných molekul proti vybraným protein-proteinovým interakcím při rakovině s použitím přístupu na bázi fragmentů.

Výzkumný plán a metodologie

Při cílení proti vybraným protein-proteinovým interakcím (PPI) použijeme přístup založený na využití malých fragmentů (FBDD) spolu se standardními způsoby identifikace a rozvíjení molekul. FBDD se ukázal být velmi důležitým pro cílení takzvaných „neléčitelných“ PPI. Úspěšnost tradičních přístupů pro identifikaci malých molekul, jakým je např. „high-throughput screening“ (HTS) bude s použitím FBDD vyšší a napomůže odhalení nových možností modifikací již existujících molekul nebo k identifikaci molekul nových. Tento přístup přinese inhibitory PPI, které mohou být dále rozpracovány v léčiva nebo chemické sondy k dalšímu zkoumání vybraných PPI cílů za účelem lepšího pochopení základních biologických procesů. Zaměříme se na recidivující akutní lymfoblastickou leukémií s mutacemi cytosolické 5'-nukleotidázy II (cN-II), MLL fúzí řízenou akutní leukémií a také na nové protein-proteinové interakce identifikované v rámci spolupráce s KU Leuven. V tomto PB budeme intenzivně používat nové FPLC a preparativní LC přístroje navržené v kapitálové investici tohoto projektu.

Spolu s odbornými znalostmi ve všech směrech strukturní charakterizace proteinových komplexů s proteiny nebo malými molekulami a prostředky integrativní strukturní biologie, byl zaveden funkční plán použití FBDD. Skládá se z využití domácí fragmentové knihovny sestavené pro testování pomocí NMR experimentů buď sledováním ligandu nebo proteinu spolu s biofyzikální validací a strukturní charakterizací komplexů proteinů s malými molekulami za použití rentgenové krystalografie nebo NMR spektroskopie.

Budeme hledat molekuly v optimalizované domácí knihovně fragmentů proti vybraným protein-proteinovým komplexům pomocí ligandem detekovaných STD NMR experimentů. První kolo testování bude provedeno ve směsích po pěti fragmentech s následným potvrzením pozitivních výsledků v nezávislém experimentu. Informace o ligandech získané z STD experimentů budeme také využívat pro identifikaci částí fragmentů odpovědných za vazbu. V dalším kroku charakterizujeme vazebné rozhraní fragmentu na protein s použitím na proteinu detekovaných NMR experimentů, což umožní výběr látek, které se váží na cílové rozhraní protein-proteinové interakce. Vazebná afinita fragmentů bude nezávisle potvrzena pomocí komplementárních biofyzikálních metod, jakými jsou rezonance povrchového plazmonu, izotermální titrační kalorimetrie nebo „micro-scale“ termoforéza.

Získané poznatky budou využity k dalšímu hledání molekul založením jak na základě chemické struktury, tak na podrobné znalosti vazebného místa. Druhá generace fragmentů bude vybrána z komerčně dostupných sloučenin, odvozených od původních výsledků. Budeme porovnávat jejich vazebné chování a navrhujeme další úpravy. Tento postup přinese molekuly s vazebnou afinitou dostatečnou pro rentgenovou krystalografii. Některé proteinové cíle, např. IBD oblast LEDGF/p75, nejsou přístupné krystalizaci a jejich komplexy budou strukturně charakterizovány pomocí NMR. Vývoj medicínské chemie a testování vyvinutých sloučenin v buněčných testech, jakož i na zvířecích modelech bude prováděno našimi spolupracovníky v KU Leuven.

Časový plán

2018-2019/20

- Validace možnosti cílení proti cN-II.
- Strukturní charakterizace interakce MLL-LEGF/p75 s inhibitory identifikovanými metodou HTS pomocí NMR spektroskopie a jejich rozvoj.
- Optimalizace knihovny fragmentů

2018/19-2022

- Testování fragmentů proti vybraným cílům (cN-II, MLL-LEDGF/p75, nově identifikované cíle).
- Validace nově identifikovaných protein-proteinových interakcí jako terapeutických cílů.

2019/20-2022

- Validace identifikovaných molekul fragmentů.
- Strukturní a biofyzikální charakterizace identifikovaných fragmentů.
- Rozpracování fragment a vývoj inhibitoru.

Plánované publikace a patenty

Publikace

	Jimp	<i>Journal of Biological Chemistry</i> <i>Journal of Molecular Biology</i> <i>Journal of Medicinal Chemistry</i> <i>Plos one</i>
2018	2	
2019	2	
2020	2	
2021	2	
2022	2	
Celkem	10	

Patenty a patentové přihlášky

	Patenty (udělené)	Mezinárodní patentové přihlášky (podané)	<i>Očekáváme ochranu duševního vlastnictví v následující oblasti: Látky s protileukemickou aktivitou</i>
2018	0	0	
2019	0	0	
2020	0	0	
2021	0	1	
2022	1	0	
Celkem	1	1	

Zahraniční spolupráce

- Prof. Zeger Debyser a Dr. Patrick Chaltin, KU Leuven, Belgie.